

人乳头瘤病毒 16 型 L2E7 融合蛋白的优化表达、制备及其对肿瘤生长的抑制作用

姜云水¹, 李剑波¹, 高孟¹, 任皎², 金素凤¹, 陈刚¹, 吴洁¹, 庄昉成¹, 田厚文²

1 浙江省医学科学院病毒病研究所 浙江省医学生物工程疫苗研究开发重点实验室, 浙江 杭州 310052

2 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 102206

姜云水, 李剑波, 高孟, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 L2E7 融合蛋白的优化表达、制备及其对肿瘤生长的抑制作用. 生物工程学报, 2015, 31(4): 566-576.

Jiang YS, Li JB, Gao M, et al. Optimized expression, preparation of human papillomavirus 16 L2E7 fusion protein and its inhibitory effect on tumor growth in mice. Chin J Biotech, 2015, 31(4): 566-576.

摘要: 为提高人乳头瘤病毒 (HPV) 16 型治疗性融合蛋白疫苗 HPV16 L2E7 在大肠杆菌中的表达量, 根据大肠杆菌偏爱密码子, 对 HPV16 *l2e7* 基因进行密码子优化, 优化后的基因分别插入到 pGEX-5X-1、pQE30 和 pET41a 表达载体中, 转化 JM109、JM109 (DE3) 和 BL21 (DE3) 表达菌, 筛选出高表达菌株 pET41a-HPV16s/l2e7/BL21 (DE3), 目的蛋白从占全菌蛋白的 10% 以下提高到约 28%, 优化接种量、IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间, 获得最佳表达条件; 通过 15 L 发酵罐发酵, SP Sepharose Fast Flow、Q Sepharose Fast Flow 和 Superdex 200 pg 纯化及复性 HPV16 L2E7 融合蛋白, 制备的融合蛋白纯度可达 95% 以上, 经 SDS-PAGE、Western blotting 鉴定证实, 制备的 HPV16 L2E7 蛋白加 CpG 佐剂对小鼠移植瘤生长具有明显的抑制作用, 有 75% (6/8) 的小鼠不成瘤, 为后续的疫苗产业化奠定基础。

关键词: 人乳头瘤病毒 16 型, 优化表达, 发酵, 纯化, 宫颈癌, 疫苗

Received: July 23, 2014; **Accepted:** September 22, 2014

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z490), Science and Technology Planning Project of Zhejiang Province (No. 2012F10005).

Corresponding author: Fangcheng Zhuang. Tel/Fax: +86-571-88861601; E-mail: fczhuang@163.com

Houwen Tian. Tel/Fax: +86-10-58900881; E-mail: houwent@126.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA02Z490), 浙江省科技计划 (No. 2012F10005) 资助。

网络出版时间: 2014-10-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140390.html>

Optimized expression, preparation of human papillomavirus 16 L2E7 fusion protein and its inhibitory effect on tumor growth in mice

Yunshui Jiang¹, Jianbo Li¹, Meng Gao¹, Jiao Ren², Sufeng Jin¹, Gang Chen¹, Jie Wu¹, Fangcheng Zhuang¹, and Houwen Tian²

¹ Medical & Biological Vaccine R&D Key Laboratory of Zhejiang Province, Institute of Virus Disease, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310052, Zhejiang, China

² National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 102206, China

Abstract: HPV16 L2E7 is a fusion protein used for therapeutical vaccine targeting HPV virus. To increase its expression in *Escherichia coli*, we optimized the codon usage of HPV16 *l2e7* gene based on its codon usage bias. The optimized gene of HPV16 *sl2e7* was cloned into three different vectors: pGEX-5X-1, pQE30, ET41a, and expressed in JM109, JM109 (DE3) and BL21 (DE3) lines separately. A high expression line was selected with pET41a vector in BL21 (DE3) cells. After optimization of the growth condition, including inoculation amount, IPTG concentration, induction time and temperature, the expression level of HPV16 L2E7 was increased from less than 10% to about 28% of total protein. HPV16 L2E7 protein was then purified from 15 L culture by means of SP Sepharose Fast Flow, Q Sepharose Fast Flow and Superdex 200 pg. After renaturing, HPV16 L2E7 protein with $\geq 95\%$ purity was achieved, which was confirmed via SDS-PAGE gel and Western blotting. The combined use of purified HPV16 L2E7 and CpG helper has shown clear inhibition of tumor growth in mice injected with tumor cells, with six out of eight mice shown no sign of tumor. This study lays a solid foundation for a new pipeline of large-scale vaccine production.

Keywords: human papillomavirus 16, optimized expression, fermentation, purification, uterine cervica cancer, vaccines

根据世界卫生组织统计,宫颈癌是当前造成妇女癌症死亡的主要因素之一,严重威胁妇女健康^[1-3]。分子流行病学调查结果证实,生殖道的高危型人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)感染与宫颈癌有着十分密切的关系,高危型 HPV 的慢性、持续性感染被认为是宫颈癌及其癌前病变的主要原因,HPV16、18 型是最常见的型别,其中约 55%的宫颈癌与 HPV16 型感染相关^[2,4-5]。目前对宫颈癌的治疗主要采用放化疗和手术治疗,副作用大、复发率较高且花费较大。采用特异性的免疫方法即疫苗接种的办法预防和治疗 HPV 的感染是有效预防宫颈癌的

重要手段之一。目前预防性疫苗研究已取得较大进展,在美国等发达国家已经上市使用,但其仅用于没有感染过 HPV 的人群^[6-7],针对已有的 HPV 持续性感染和宫颈癌及癌前病变患者,尚未有十分有效的免疫治疗方法用于临床,因此,研制高效、廉价的而且具备治疗作用的 HPV 疫苗迫在眉睫。

由于 HPV 在体外难于培养及其致癌性,完整的病毒颗粒不大可能发展为疫苗,只能研制基因工程疫苗。病毒的次要衣壳蛋白 L2 同时具有中和抗体表位和细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位,肿瘤相

关抗原 E7 是诱导和维持癌细胞恶性表型所必需的蛋白, L2 与 E7 融合后免疫机体能产生体液免疫和细胞免疫^[8-9]。本课题组选择 HPV16 型 L2 蛋白融合已去除转化活性的 E7 蛋白作为治疗性疫苗的靶抗原, 通过密码子优化、表达载体及菌株的筛选, 利用基因工程技术获得了 1 株高效表达 HPV16 L2E7 融合蛋白的工程菌株; 然后通过优化表达菌的培养诱导条件, 摸索高密度发酵工艺、层析纯化和复性工艺, 制备了纯度 95% 的 HPV16 L2E7 融合蛋白, 复性后的蛋白在初步的动物实验中显示了显著的肿瘤抑制作用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株

质粒 pET41a、pGEX-5X-1、pQE30 和大肠埃希杆菌 *Escherichia coli* JM109、JM109 (DE3)、BL21 (DE3) 由浙江大学医学生物技术实验室馈赠。pET30a-*l2e7* 质粒由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所应急技术中心提供, 含 HPV16 L2 完整的编码区序列及经修饰的完整 E7 编码区序列。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, Ex Taq 酶购自 Invitrogen 公司。DNA marker 购自天为时代公司。羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶标记物购自美国 Sigma 公司。HPV16 型 L2 单抗和 E7 单抗均由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所应急技术中心馈赠。胰蛋白胍和酵母提取物购自 OXOID 公司。SP Sepharose Fast Flow、Q Sepharose Fast Flow 和 Superdex 200 pg 均购自 GE Healthcare 公司。

1.1.3 实验动物

C57BL/6(H-2b)小鼠, 雌性, 6-8 周龄, 购自中国医学科学院实验动物繁育中心。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的设计与合成

以 pET30a-*l2e7* 质粒中 *l2e7* 基因为模板, 在保持编码的产物蛋白氨基酸序列不变的前提下, 结合大肠杆菌优势密码子及 mRNA 的二级结构分析, 利用基因密码子简并性原则, 设计出适合在大肠杆菌中表达 HPV16 L2E7 融合蛋白的核苷酸序列, 命名为 HPV16*sl2e7*。设计好的基因序列交予上海生工生物工程技术服务有限公司合成并插入 pGEM-T Easy 载体中, 命名为 pGEM-T-HPV16*sl2e7*。

1.2.2 重组表达载体的构建

根据载体序列分别设计 3 套引物, 引物中加入 *EcoR* 和 *Xho* 酶切位点序列, 采用 PCR 方法从 pGEM-T-HPV16*sl2e7* 扩增出 HPV16*sl2e7* 片段。PCR 产物和载体 pGEX-5X-1、pQE30、pET41a 分别用核酸内切酶 *EcoR* 和 *Xho* 酶切。酶切后的载体和 HPV16*sl2e7* 基因片段用 T4 DNA 连接酶连接。连接后的产物分别转化感受态 JM109、JM109 (DE3) 和 BL21 (DE3): pGEX-HPV16*sl2e7*、pQE30-HPV16*sl2e7* 转化 JM109, pET41a-HPV16*sl2e7* 转化 JM109 (DE3) 和 BL21 (DE3)。抗性筛选出来的克隆以 PCR 法验证, 验证结果阳性的克隆进行基因测序验证。

1.2.3 高表达菌株的筛选

将上述筛选出的阳性克隆菌株 pGEX-HPV16*sl2e7*/JM109、pQE30-HPV16*sl2e7*/JM109、pET41a-HPV16*sl2e7*/BL21 (DE3)、pET41a-HPV16*sl2e7*/JM109 (DE3) 以及对照菌株 pET30a-

HPV16/L2E7/BL21 (DE3) 根据载体的抗性分别接种于含抗生素 Amp 和 Kana (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min 振荡培养至 OD_{600} 达 0.6–1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 3 h。表达菌进行 SDS-PAGE 分析, 根据表达量的高低筛选出目的菌株用于后续研究。

1.2.4 HPV16 L2E7 融合蛋白的表达条件优化

筛选出的高表达菌株 pET41a-HPV16s/L2E7/BL21 (DE3) 分别进行接种量和诱导条件的优化。表达条件的优化采用摇瓶试验方法, 接种量分别选择 0.5%、2% 和 4%, IPTG 浓度分别选择终浓度为 0.1、0.5 和 1.0 mmol/L, 诱导温度选择 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$, 诱导时间分别选择 2、4、6 和 8 h, 接种量比较采取每小时取样比浊法检测菌液 OD_{600} 值; 诱导条件比较采用离心收集菌体, 进行 8% SDS-PAGE, 并用 Quantity One 软件分析蛋白表达量的百分比。高密度发酵条件以摇瓶摸索的结果为基础进一步优化。

1.2.5 HPV16 L2E7 融合蛋白的发酵

高表达菌株 pET41a-HPV16s/L2E7/BL21 (DE3) 经 LB 摇床培养至 OD_{600} 达 0.8–1.0 时, 以 5% 的接种比例接种至含 TB 培养基的 15 L 发酵罐中 (德国 B.BRAUN, Biostat C plus) 中, 发酵温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌速度 300–700 r/min, pH 维持在 7.0 左右, 溶氧保持在 20% 以上, 期间恒定流加补料 A (酵母粉 100 g/L, 柠檬酸 5 g/L, 氯化镁 5 g/L, 氯化钙 2 g/L), 定时取样监测菌体密度, 当 OD_{600} 达 25 左右时, 降温至 30 $^{\circ}\text{C}$, 加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L 进行诱导, 期间根据发酵液中的葡萄糖浓度、pH 值和溶氧反馈流加补料 B (蛋白胨 150 g/L, 酵母粉 100 g/L, 葡萄糖 250 g/L), 诱导 4 h 后下罐离心收获。离

心后的菌体 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.6 HPV16 L2E7 融合蛋白的纯化及柱上复性

发酵收获的菌体经高压匀浆破碎后, 离心收获包涵体沉淀, 包涵体经洗涤后用变性缓冲液 (20 mmol/L Tris-Cl, 8 mol/L 尿素, 5 mmol/L DTT, 2 mmol/L EDTA-2Na, pH 8.0) 溶解, 离心收集上清。层析柱 SP Sepharose Fast Flow 用平衡缓冲液 (20 mmol/L Tris-Cl, 8 mol/L 尿素, 2 mmol/L DTT, pH 8.0) 平衡, 离心上清上柱吸附, 用缓冲液 B 冲洗平衡后用缓冲液 C (20 mmol/L Tris-Cl, 8 mol/L 尿素, 2 mmol/L DTT, 1 mol/L NaCl, pH 8.0) 梯度洗脱, 收集目的蛋白峰。层析柱 Q Sepharose Fast Flow 用缓冲液 D (20 mmol/L Tris-Cl, 8 mol/L 尿素, 10 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSG, pH 8.0) 平衡, 目的蛋白峰收集液稀释后上柱吸附, 用缓冲液 D 冲洗平衡至基线后, 线性梯度缓慢增加缓冲液 E (20 mmol/L Tris-Cl, 1 mol/L 尿素, 10 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSG, pH 8.0) 浓度至 100%, 最后用缓冲液 F (20 mmol/L Tris-Cl, 1 mol/L 尿素, 10 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSG, 1 mol/L NaCl, pH 8.0) 线性梯度洗脱, 收集目的蛋白峰。复性后的目的蛋白在层析柱 Superdex 200 pg 上进一步纯化及替换缓冲液, 复性后的蛋白最终替换至缓冲液 G (20 mmol/L Tris-Cl, 0.1 mol/L 精氨酸, pH 7.5) 中保存。最终纯化产物进行 SDS-PAGE、Western blotting、N 端测序等鉴定。

1.2.7 HPV16 L2E7 融合蛋白的肿瘤生长抑制实验

实验分为 PBS 对照组、HPV16 L2E7+CpG 组 (CpG 10 $\mu\text{g}/\text{只}$, HPV16 L2E7 分别为 30 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{只}$), 每组 8 只小鼠, 将 1.2×10^4 个 TC-1 肿瘤细胞于 C57BL/6 小鼠腹股沟皮下注射, 第二天经肌肉分别注射 PBS 和不

同剂量的 HPV16 L2E7 蛋白+CpG 佐剂, 100 μ L/只, 两周后相同剂量蛋白加强免疫, 每周观察肿瘤生长情况。

2 结果

2.1 密码子优化、表达载体的构建及高表达菌株的筛选

密码子优化后的大小为 1 713 bp 的全基因片段插入 pGEM-T Easy 质粒中, 获得质粒 pGEM-T-HPV16*sl2e7*, HPV16*sl2e7* 密码子优化序列经测序与设计的理论序列完全相符。以质粒 pGEM-T-HPV16*sl2e7* 为模板进行 PCR 扩增, 引物端添加 *EcoR* 和 *Xho* 内切酶位点, 获得 1 731 bp 的 PCR 产物, 经 *EcoR* 和 *Xho* 双酶切后插入表达载体 pGEX-5X-1、pQE30、pET41a 中, 成功构建 HPV16 L2E7 的原核表达载体 pGEX-HPV16*sl2e7*、pQE30-HPV16*sl2e7*、pET41a-HPV16*sl2e7*, 构建好的表达载体分别转化感受态 JM109、JM109 (DE3) 和 BL21 (DE3) 筛选得到表达菌 pGEX-HPV16*sl2e7*/JM109、pQE30-HPV16*sl2e7*/JM109、pET41a-HPV16*sl2e7*/JM109 (DE3)、pET41a-HPV16*sl2e7*/BL21 (DE3)。表达菌经 PCR 法验证, 扩增出与理论值相符的约 1.7 kb 的产物片段 (图 1), 表达载体经测序证明目的基因插入正确, 序列未发生碱基突变。

IPTG 诱导表达结果 (图 2) 显示, 与基因密码子优化前的对照菌株 pET30a-HPV16*l2e7*/BL21 (DE3) 相比, 菌株 pET41a-HPV16*sl2e7*/BL21 (DE3) 目的蛋白的表达量得到了明显提高, 目的蛋白从占全菌蛋白的 10% 以下提高到约 28%, 因此确定 pET41a-HPV16*sl2e7*/BL21 (DE3) 作为最优菌株用于后续蛋白制备研究。

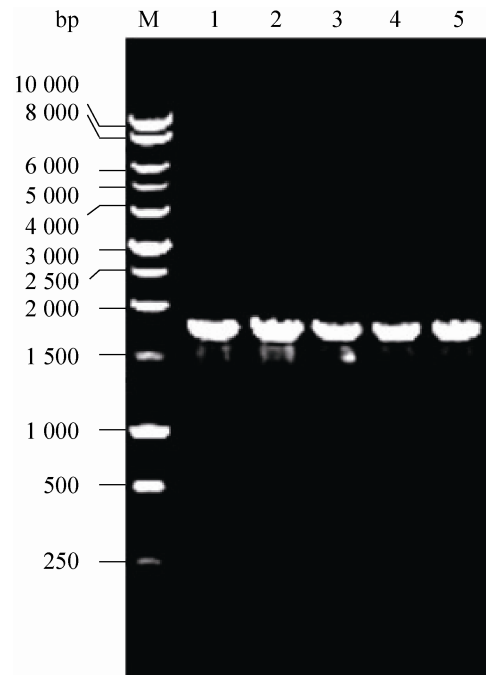


图 1 不同表达菌株的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of different expression strains by PCR. M: DNA marker; 1: PCR product of pGEX-HPV16*sl2e7*/JM109; 2: PCR product of pQE30-HPV16*sl2e7*/JM109; 3: PCR product of pET41a-HPV16*sl2e7*/JM109 (DE3); 4: PCR product of pET41a-HPV16*sl2e7*/BL21 (DE3); 5: PCR product of pET30a-HPV16*l2e7*/BL21 (DE3).

2.2 HPV16 L2E7 融合蛋白的表达条件优化与发酵

前期研究表明本菌株繁殖 30 代 (10–15 h) 内质粒保有率 95%, 因此整个发酵周期控制在 10–15 h 内。不同接种量 OD_{600} 检测结果显示 2%、4% 和 6% 的接种量培养 4 h 内均已进入对数生长期, 而 0.5% 的接种量进入对数生长期的时间明显推迟 (图 3); 不同 IPTG 浓度不同时间诱导结果显示 0.5 和 1.0 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导的目的蛋白表达量明显高于 0.1 mmol/L, 诱导 2 h 和 4 h, 目的蛋白表达百分比保持稳定, 6 h 后开始下降 (图 4); 30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 诱导, 目的蛋白的表

达量未见明显差异 (图 5)。高密度发酵条件以摇瓶摸索的结果为基础进行优化,接种量以 5% 和 10% 进行发酵实验,10% 接种量获得的菌体总量比 5% 高,但是目的蛋白的相对表达量低于 5%,而且发酵后期细菌增长过快造成补料添加速度跟不上,因此选择 5% 的接种量;诱导则采用 1.0 mmol/L IPTG 浓度 37 °C 诱导 4 h。15 L 发酵罐的发酵工艺为:摇瓶活化的菌种当 OD_{600} 达 0.8–1.0 时,以 5% 的接种量接种,37 °C 培养约 5 h 左右, OD_{600} 达到 25 以上,降温至 30 °C,加入 IPTG 进行诱导,诱导 4 h 后下罐收获发酵液约 10 L,离心后收获菌体湿重约 800 g。

2.3 HPV16 L2E7 融合蛋白的纯化及复性

HPV16 L2E7 在大肠杆菌内主要以不溶的包涵体形式存在,发酵产物经高压匀浆破碎离

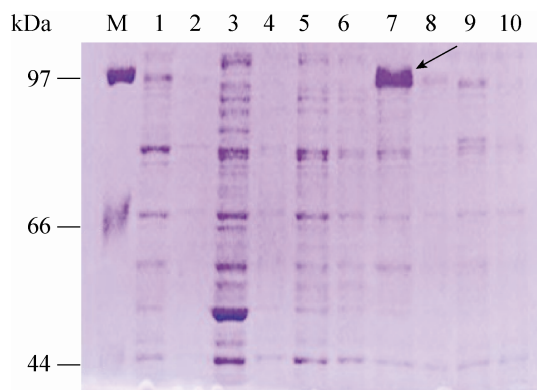


图 2 不同表达菌株表达量的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Expression level of expression strains by SDS-PAGE analysis. M: protein marker; 1: pQE30-HPV16sl2e7/JM109 induced; 2: pQE30-HPV16sl2e7/JM109 non-induced; 3: pGEX-HPV16sl2e7/JM109 induced; 4: pGEX-HPV16sl2e7/JM109 non-induced; 5: pET41a-HPV16sl2e7/JM109 (DE3) induced; 6: pET41a-HPV16sl2e7/JM109 (DE3) non-induced; 7: pET41a-HPV16sl2e7/BL21 (DE3) induced; 8: pET41a-HPV16sl2e7/BL21 (DE3) non-induced; 9: pET30a-HPV16l2e7/BL21 (DE3) induced; 10: pET30a-HPV16l2e7/BL21 (DE3) non-induced.

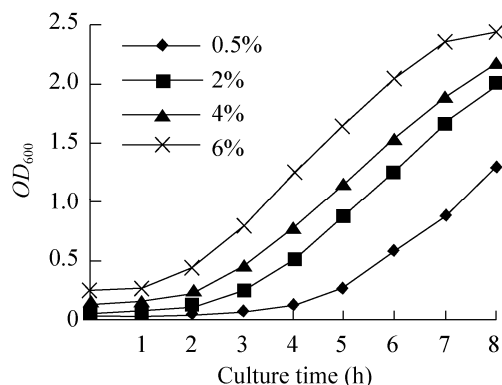


图 3 接种量对重组表达菌株 pET41a-HPV16sl2e7/BL21 (DE3) 生长的影响

Fig. 3 Effect of inoculation volume on the growth of the recombinant expression strain pET41a-HPV16sl2e7/BL21 (DE3).

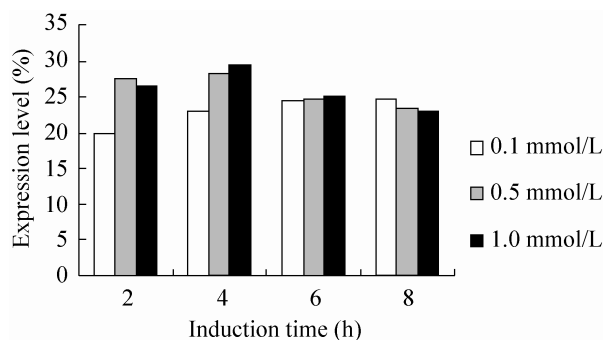


图 4 IPTG 浓度和诱导时间对 HPV16 L2E7 融合蛋白表达量的影响

Fig. 4 Effect of IPTG concentration and induction time on the expression of HPV16 L2E7 fusion protein.

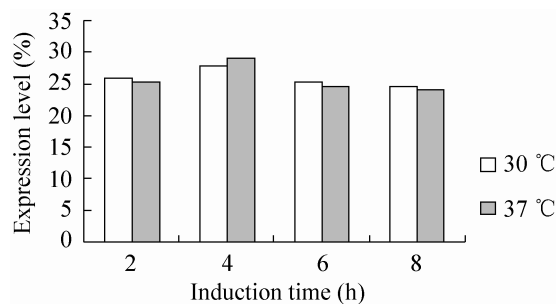


图 5 诱导温度和诱导时间对 HPV16 L2E7 融合蛋白表达量的影响

Fig. 5 Effect of induction temperature and induction time on the expression of HPV16 L2E7 fusion protein.

心后获得包涵体、包涵体经洗涤去除大量杂蛋白(图 6A)、8 mol/L 尿素变性溶解后经 SP Sepharose Fast Flow 初步纯化, Q Sepharose Fast Flow 柱上复性, Superdex 200 pg 精细纯化后获得纯度 95% 目的蛋白的纯化产物(图 6B)。纯化产物 Western blotting 结果显示, 在相对分子量约 97 kDa 处可见与 L2 和 E7 的抗体反应带(图 6C)。纯化产物 SDS-PAGE 割胶纯化后的蛋白质 N 端测序

结果显示与理论序列相符。

2.4 HPV16 L2E7 融合蛋白对肿瘤生长的抑制作用

PBS 对照组在接种肿瘤细胞后 28 d 内全部成瘤, 抑瘤率 (0/8, 0%), HPV16 L2E7+CpG 30 μ g 组有 2 只小鼠不成瘤, 抑瘤率 (2/8, 25%), HPV16 L2E7+CpG 60 μ g 和 90 μ g 组有 6 只小鼠不成瘤, 抑瘤率 (6/8, 75%) (图 7)。与 PBS 对

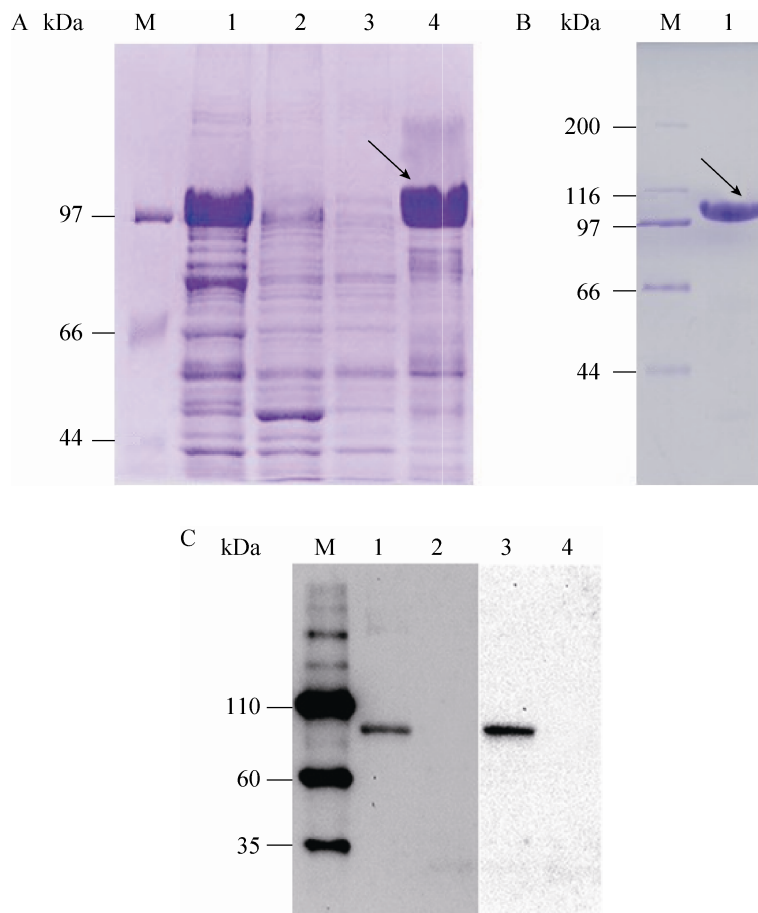


图 6 HPV16sL2E7 融合蛋白的纯化和鉴定

Fig. 6 Purification and analysis of HPV16 L2E7 fusion protein. (A) SDS-PAGE analysis of HPV16 L2E7 protein in *E. coli* cell lysate and inclusion body. M: protein marker; 1: precipitation from *E. coli* cell lysate; 2: supernatant from *E. coli* cell lysate; 3: supernatant from inclusion body washing; 4: precipitation from inclusion body washing. (B) SDS-PAGE analysis of purified HPV16 L2E7 fusion protein. M: protein marker; 1: purified HPV16 L2E7 fusion protein. (C) Western blotting analysis of purified HPV16 L2E7 fusion protein. M: protein marker; 1: HPV16 L2E7 protein reaction by McAb L2; 2,4: negative control; 3: HPV16 L2E7 protein reaction by McAb E7.

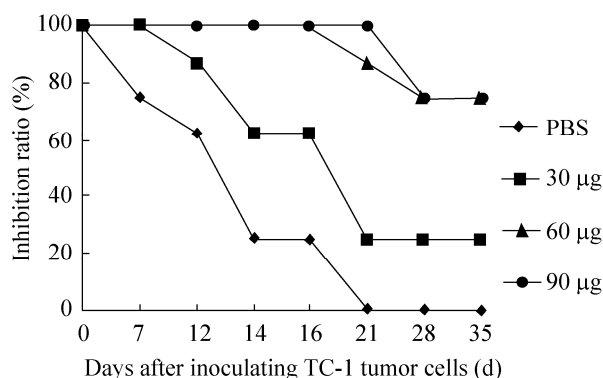


图 7 HPV16 L2E7 蛋白对 TC-1 肿瘤生长的抑制效果
Fig. 7 *In vivo* inhibition experiments of HPV16 L2E7 protein against the growth of TC-1 tumor.

对照组相比, HPV16 L2E7+CpG 30 μg 组的抑瘤率虽有不同, 但差异无统计学意义 ($P=0.13$), HPV16 L2E7+CpG 60 μg 和 90 μg 组则差异性极显著 ($P < 0.01$), 而 HPV16 L2E7+CpG 30 μg 组和 60 μg、90 μg 组则差异显著 ($0.05 > P > 0.01$)。

3 讨论

治疗性疫苗的作用机制主要是诱发强的 CTL 反应, 从而识别并杀伤被病毒感染的细胞。HPV 治疗性疫苗的靶抗原主要为衣壳蛋白和早期与肿瘤相关的蛋白。主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2 中含有中和抗原表位和 CTL 表位, 其与肿瘤相关抗原 E6 或 E7 融合后能刺激机体产生体液免疫和细胞免疫^[8], E6、E7 基因在癌前病变和宫颈癌中是持续表达的, 它们通过失活 P^{Rb} 和 P⁵³ 抑癌蛋白, 破坏细胞周期调控, 从而导致上皮细胞的恶性转化^[10-12], L1 或 L2 融合去除转化活性的 E6 和或 E7 蛋白可作为治疗性疫苗的靶抗原^[13-15]。相对于型特异性的 L1 基因, L2 全长或 L2 N 端高度保守序列能诱发生广泛交叉保护作用的中和抗体^[16-19]; E7 序列

较 E6 更为保守, 而且更容易获得高水平的表达^[20], 因此选择 L2 和 E7 蛋白作为 HPV16 治疗性疫苗的靶抗原。

大肠杆菌由于其遗传背景清楚、成本低廉、生产率高、操作简单成为克隆和表达外源基因的首选^[21-22], 但是由于种属特异性等原因, 外源蛋白在大肠杆菌中表达往往存在表达量低、表达产物活性低或者以无活性的包涵体形式存在, 给后续的纯化和复性带来了极大的挑战^[23]。经过几十年的发展, 大量商用的表达载体及配套菌株可供选择, 为了获得高表达的具有活性的目的蛋白用于后续的研究以及产业化, 需要考虑多方面的因素, 包括密码子的偏好性、表达载体和表达宿主菌的筛选、表达条件的优化等^[22,24]。合作单位前期构建了表达系统 pET30a-HPV16l2e7/BL21(DE3), 表达的蛋白经动物实验证明了具有抗肿瘤移植的作用^[25]。但是表达量偏低, 难以满足产业化的要求, 因此, 本研究首先进行了密码子优化, 用大肠杆菌的偏爱密码子替换了原始密码子, 从基因层面上提高了密码子的适应性。表达载体及菌株的选择也是影响蛋白表达的因素之一, 优化后的基因分别选用 3 个不同体系的表达载体和相应的菌株来进行表达量的筛选, 筛选的结果显示: 与基因密码子优化前的原始菌株 pET30a-HPV16l2e7/BL21 (DE3) 相比, 菌株 pET41a-HPV16sl2e7/BL21 (DE3) 目的蛋白的表达量得到了明显的提高。

获得高表达菌株 pET41a-HPV16sl2e7/BL21 (DE3) 后, 本实验在摇瓶上选择接种量、IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间几个参数进行了优化, 为后续的高密度发酵提供了初步依据。接种量的大小直接影响发酵周期, 采用稍大的

接种量可以缩短菌体生长的迟滞期,明显缩短发酵时间,但太大的接种量会因为带入过多的代谢废物,反而影响菌体的生长。从图 3 结果可以看出,除了 0.5%的接种量,2%、4%和 6%的接种量菌体的生长速度差不多,培养 4 h 内均已进入对数生长期,因此在发酵罐上进一步摸索 5%和 10%的接种量,以期通过提高接种量在一定的时间内获得更高的菌体密度,最终提高产物的比生产率(单位体积单位时间内产物的产量),但是发现过高的菌体密度造成了目的蛋白相对表达量的降低,同时增大了发酵体系的负担,因此选择 5%的接种量。IPTG 为异丙基- β -D-硫代半乳糖苷,是一种十分有效的乳糖操纵子的诱导剂,可与阻遏物结合促进基因的表达。以 IPTG 作为诱导剂,其作用是和阻遏物结合,起解阻遏作用。因此当所加入的 IPTG 量足以封闭所有阻遏物位点时,即为理论上的最佳浓度。IPTG 浓度过高时,对菌体具有一定的毒性作用,影响细胞的繁殖和生长。对于带普通 T7 启动子载体,终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 可以实现完全诱导,而带有 T7 *lac* 启动子的载体则需要终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 才能完全诱导。pET-41a 为带有 T7 *lac* 启动子的载体,理论上需要 1 mmol/L 的 IPTG 才能完全诱导。摇瓶实验结果表明 0.5 和 1.0 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导的目的蛋白表达量明显高于 0.1 mmol/L,综合考虑发酵培养时的菌体密度较高,所以选择终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,诱导时间则根据实验结果定为 4 h。

HPV16 L2E7 蛋白是以不溶的包涵体形式表达的,表达的蛋白因为错误折叠、二硫键错配等原因需要变性溶解后复性获得活性蛋白,尽管 37 °C 和 30 °C 诱导的总表达量无明显差异,

但是 30 °C 诱导表达的蛋白从包涵体纯度、变性容易程度以及复性率上高于 37 °C 诱导表达的蛋白,这可能是由于 37 °C 诱导蛋白表达速率过高,造成蛋白错误折叠率高有关,低温诱导有利于提高蛋白的折叠率从而提高蛋白的可溶性及活性。后期进行的 25 °C、30 °C 和 37 °C 诱导表达结果表明,30 °C 和 37 °C 诱导表达的蛋白还是以包涵体为主,25 °C 诱导表达的蛋白则呈现胶体状,需要长时间的离心才能分离,蛋白的可溶性和纯度明显提高,但是 25 °C 诱导在得率上降低明显,而且诱导时间大大延长,不利于后期产业化的工艺。大肠杆菌表达的变性蛋白的复性方法有透析复性、稀释复性和层析柱上复性等^[26-27],近年来层析柱上复性由于效率高且兼具纯化作用而成为研究热点^[28],本实验通过 Q Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱上复性的方法,获得了可溶的具有免疫活性的目的蛋白,但是复性率偏低,未复性的蛋白在柱上沉淀吸附,今后将进一步优化复性条件以提高复性得率。

本实验制备的蛋白在小鼠荷瘤模型上显示出特异性的抑制肿瘤作用且具有剂量效应,与 PBS 对照组和 HPV16 L2E7+CpG 30 μ g 组相比,HPV16 L2E7+CpG 60 μ g 以上即具有显著的抑瘤效果,但是最终还是 25%的小鼠诱发肿瘤,说明单独免疫一定剂量的融合蛋白疫苗诱发的免疫反应有限,今后进一步加大剂量以及与病毒载体疫苗等其他类型的疫苗联合免疫将有助于提高免疫效果。

REFERENCES

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:

- GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893–2917.
- [2] WHO/ICO information centre on HPV and cervical cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related cancers in world. Summary Report 2010[EB/OL]. [2010-06-22]. <http://www.who.int/hpvcentre>.
- [3] Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol*, 2011, 22(12): 2675–2686.
- [4] Eklund C, Forslund O, Wallin KL, et al. The 2010 global proficiency study of human papillomavirus genotyping in vaccinology. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(7): 2289–2298.
- [5] Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 2006, 110(5): 525–541.
- [6] Siddiqui MA, Perry CM. Human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil). *Drugs*, 2006, 66(9): 1263–1271.
- [7] Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 2007, 369(9580): 2161–2170.
- [8] Schiller JT, Lowy DR. Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1(4): 571–581.
- [9] Lacey CJ, Thompson HS, Monteiro EF, et al. Phase IIa safety and immunogenicity of a therapeutic vaccine, TA-GW, in persons with genital warts. *J Infect Dis*, 1999, 179(3): 612–618.
- [10] Albers AE, Kaofmann AM. Therapeutic human papillomavirus vaccination. *Public Health Genomics*, 2009, 12(516): 331–342.
- [11] Stanley MA. Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies. *J Gen Virol*, 2012, 93 (Pt 4): 681–691.
- [12] Münger K, Phelps WC, Bubb V, et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, 1989, 63(10): 4417–4421.
- [13] Luo WF, Han LQ, Ren J, et al. Transforming activities of the mutants of HPV16 E6 and E7 gene for Balb/c 3T3 cells. *Chin J Virol*, 2002, 18(2): 97–101 (in Chinese).
骆卫峰, 韩立群, 任皎, 等. 人乳头瘤病毒 E6 和 E7 基因及其突变体转化活性的研究. *病毒学报*, 2002, 18(2): 97–101.
- [14] Zhi HJ, Han LQ, Ren J, et al. Modification of HPV type 16 E6 and E7 genes, and analysis of stability and immunogenicity of the modified proteins. *Chin J Exp Clin Virol*, 2002, 16(2): 124–127 (in Chinese).
职慧军, 韩立群, 任皎, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 E6 和 E7 基因突变体表达蛋白的稳定性和抗原性分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, 16(2): 124–127.
- [15] Zhang H, Zhao L, Gao J, et al. Prokaryotic expression and purification of human papillomavirus type 11 L2E7 fusion protein vaccine and its immunogenicity. *Chin J Exp Clin Virol*, 2007, 21(2): 156–158 (in Chinese).
张卉, 赵莉, 高见, 等. HPV11 型 L2E7 融合蛋白的原核表达及其免疫效果观察. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2007, 21(2): 156–158.
- [16] Day PM, Gambhira R, Roden RB, et al. Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by L2 cross-neutralizing and L1 type-specific antibodies. *J Virol*, 2008, 82(9): 4638–4646.
- [17] Kawana K, Matsumoto K, Yoshikawa H, et al. A surface immunodeterminant of human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2. *Virology*, 1998, 245(2): 353–359.
- [18] Kawana K, Yasugi T, Kanda T, et al. Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers.

- Vaccine, 2003, 21(27-30): 4256-4260.
- [19] Gambhira R, Karanam B, Jagu S, et al. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. *J Virol*, 2007, 81(24): 13927-13931.
- [20] Zehbe I, Wilander E, Delius H, et al. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*, 1998, 58(4): 829-833.
- [21] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Postepy Biochem*, 2006, 52(4): 448-456.
- [22] Panda AK. Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2003, 85: 43-93.
- [23] Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J*, 2013, 32(6): 419-425.
- [24] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(5): 411-421.
- [25] Fan JT, Zhao L, Chen XQ, et al. The experimental study of HPV16 vaccines in prime-boost strategy. *Chin J Microbiol Immunol*, 2006, 26(6): 510-515 (in Chinese).
范江涛, 赵莉, 陈心秋, 等. 人乳头状瘤病毒 16 型不同基因疫苗联合免疫的实验研究. *中华微生物和免疫学杂志*, 2006, 26(6): 510-515.
- [26] Gong PS, Luo GM. Recent progress in renaturation of inclusion bodies. *China Biotechnol*, 2003, 23(12): 73-77; 94 (in Chinese).
龚平生, 罗贵民. 包涵体复性研究进展. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(12): 73-77; 94.
- [27] Misawa S, Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers (Peptide Science)*, 1999, 51(4): 297-307.
- [28] Gu ZY, Weidenhaupt M, Ivanova N, et al. Chromatographic methods for the isolation of, and refolding of protein from, *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expre Purif*, 2002, 25(1): 174-179.

(本文责编 郝丽芳)